

Travaux pratiques Systématique bactérienne

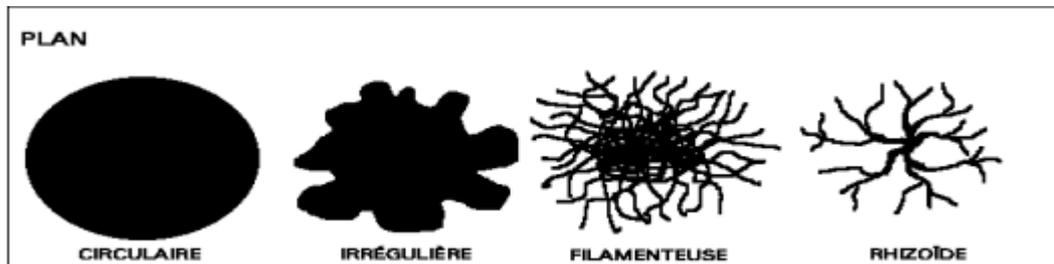
TP N° 2 : Observation macroscopique et microscopique des cultures bactériennes

Objectifs : Mise en évidence des bactéries à partir de prélèvements (Isolement et purification) par l'étude des caractères cultureux et morphologiques.

1- Observation macroscopique :

Afin d'identifier une souche microbienne, la première étape du diagnostic microbien d'une souche est la description macroscopique des colonies bien isolées ; parfois cette étude seule permet de connaître le germe qu'on a car les colonies sont typiques. Les principaux caractères à étudier sont :

- 1) **La forme** Le premier caractère important dans la description des colonies est sa forme générale... De nombreuses espèces bactériennes forment des colonies rondes. Cependant d'autres donnent des colonies aux formes plus ou moins variées :



- 2) **Le relief = élévation** Après la forme générale, il est important de regarder le relief de la colonie (un peu comme si on en faisait une coupe). Il existe plusieurs types de reliefs chez les colonies microbiennes.



3) **Le contour** : Le contour d'une colonie, c'est le bord de celle-ci.



4) **Taille** : La taille d'une colonie bactérienne est une donnée qui est parfois difficile à apprécier. En effet sur un même isolement la même espèce peut avoir différentes tailles... Pour ne pas qu'il y ait de quiproquos, il est « conventionnel » de mesurer les colonies les plus grosses qui sont parfaitement isolées. La taille d'une colonie bactérienne, si elle est mesurable, s'exprime en mm et est souvent qualifiée par un adjectif. Les termes les plus couramment utilisés sont :

- **Colonies ponctiformes** : Colonies à peine visibles, dont la taille est inférieure au millimètre
- **Petites colonies** : Colonies dont le diamètre est compris entre 1 et 2 mm
- **Colonies moyennes** : Colonies dont le diamètre est compris entre 3 et 5 mm
- **Grosses colonies** : Colonies dont le diamètre est supérieur à 5 mm.

5) **La surface** : La surface d'une colonie bactérienne peut changer d'un repiquage à l'autre. Cependant c'est un critère important car relié à d'autres caractères dont parfois la pathogénicité. On distingue les colonies **lisses = Smooth(S)** et les colonies **rugueuses (R)**



6) **La couleur** : La couleur des colonies peut être :

- Naturelle = production d'un ou plusieurs pigments par la bactérie. On peut différencier les pigments non diffusibles (seule la colonie est colorée) des pigments diffusibles (qui colorent également le milieu de culture).
- Ou dû à un colorant ou un indicateur de pH présent dans le milieu. Exemple de colonies colorées d'*E. coli* sur différents milieux.



7) **L'opacité** Les colonies opaques ne laissent pas passer la lumière contrairement aux translucides, qui laissent passer la lumière. Certaines sont très transparentes.

8) **La consistance** Elle se juge au moment du prélèvement à l'aide de l'anneau d'anse de platine stérile et refroidie. On distingue les colonies **sèches**, les **crémeuses**, et les **muqueuses**.

2. Observation microscopique des microorganismes

2.1. Observation à l'état frais : C'est l'examen microscopique de bactéries vivantes, en milieu liquide. Il permet d'apprécier leur mobilité (ou immobilité) et leur morphologie.

Préparation :

1. A partir d'une culture en milieu liquide :

Déposer sur une lame propre soit le contenu d'une « anse de platine » soit « une petite goutte » à l'aide d'une pipette Pasteur. Recouvrir la goutte d'une lamelle.

2. A partir d'une culture sur milieu solide :

Déposer une gouttelette de liquide (milieu liquide ou eau) sur la lame. Prélever une trace de culture à l'anse de platine et l'émulsionner dans le liquide. Recouvrir d'une lamelle.

1. Flamber l'anse de platine
2. Déposer une goutte de la suspension bactérienne
3. Recouvrir d'une lamelle
4. Observer au microscope

II. EXAMEN APRÈS COLORATION

L'examen après coloration permet d'observer des bactéries tuées fixées sur une lame et ayant subi l'action d'un ou plusieurs colorants. Les colorations, réalisées sur des frottis secs et fixés, sont classées en :

- Coloration simple (un seul colorant)
- Coloration différentielle type Gram
- Colorations spéciales des structures bactériennes (capsules, spores...).

Remarque :

La réalisation de frottis de bonne qualité est une condition préalable à toute coloration.

1. Réalisation du frottis :

Les frottis doivent être étalés sur la lame de verre en couche mince et régulière, puis séchés et fixés selon les étapes suivantes.

1. Notez la référence de l'échantillon sur une lame parfaitement propres et dégraissées. Prélevez stérilement à l'aide d'une anse de platine une goutte de culture bactérienne et étalez un film mince,

2. Séchage : Le séchage est effectué **auprès** de la flamme d'un bec bunsen jusqu'à ce que le frottis présente un aspect mat.

3. Fixation du frottis sec :

Cette étape consiste à tuer les bactéries et les coller sur la lame, sans en altérer la structure.

La fixation s'effectue soit par:

- La chaleur : la lame, tenue par une pince (frottis situé sur le dessus) est placée devant (pas sur) la flamme du bec Bunsen. Laisser refroidir avant d'entreprendre la coloration.
- Flambage à l'alcool.

2. Coloration à la fuchsine

La coloration à la fuchsine peut apporter des informations concernant la morphologie des germes.

Mode opératoire :

Sur le frottis fixé et refroidi :

- Faire couler la solution de fuchsine jusqu'à ce que tout le frottis soit recouvert.
- Laisser agir 1 minute.
- Rincer abondamment la lame avec le jet d'une pissette d'eau distillée, ou à l'eau du robinet jusqu'à élimination des colorants en excès.
- Sécher délicatement entre deux feuilles de papier filtre (ou buvard), **sans froter**.
- Examiner au microscope, objectif à immersion.

3. Résultats

Les bactéries sont colorées en rose. Cette coloration est intéressante pour l'observation rapide des frottis mais elle permet seulement l'étude de la morphologie des bactéries qui peut se présenter comme suit :

MORPHOLOGIE BACTERIENNE

Formes sphériques : coques	Formes allongées
<p>★Forme ronde : ● Ex. : <i>Staphylococcus</i></p> <p>★Forme ovale (ovoïde) : ● Ex. : <i>Streptococcus</i></p>	<p>★ Formes droites :</p> <p>court ■ Long ■</p> <p>épais ■ fin —</p> <p>Bouts ronds ■■ bouts carrés ■■</p> <p>Coccobaccille ● Fusiforme ●</p> <p>★ Formes particulières</p> <p>➤ Forme incurvée) ex : <i>Vibrio</i></p> <p>➤ Forme spiralée ~~~~~ ex : <i>Treponema</i></p>
<p>★Mode de groupement :</p> <p>➤ isolé ●●</p> <p>➤ par deux (diplocoques) ●●</p> <p>➤ En flamme de bougie ●● ex. : <i>Streptococcus pneumoniae</i></p> <p>➤ En grain de café ●● ex. : <i>Neisseria</i></p> <p>➤ Par quatre : tétrade ●●●● ex : <i>Micrococcus</i></p> <p>➤ En amas ●●●●●●●●</p> <p>➤ En chaînette ●●●●●●●●</p>	<p>★ Modes de groupement :</p> <p>➤ isolés ■■■</p> <p>➤ diplobacille ■■</p> <p>➤ En amas ■■■</p> <p>➤ En chaînette ■■■■■</p> <p>➤ En palissade ■■■ ■■■ ■■■</p>

Travail des étudiants :

- Dans un tableau donner une description macroscopique des colonies observées ?

- Dessiner et interpréter votre observation sous microscope après coloration ?